

14.10.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

JP04/15576

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年10月14日

出願番号
Application Number: 特願2003-354413
[ST. 10/C]: [JP 2003-354413]

REC'D 02 DEC 2004	
WIPO	PCT

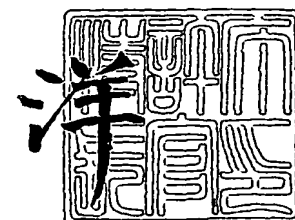
出願人
Applicant(s): 西田 幸二
前田 和久

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 J103919395
【提出日】 平成15年10月14日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府茨木市春日 1 丁目 1 6 - 5 3 - 6 0 2
 【氏名】 西田 幸二
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府高石市羽衣 2 丁目 4 - 3 3
 【氏名】 前田 和久
【特許出願人】
 【識別番号】 503105952
 【氏名又は名称】 西田 幸二
【特許出願人】
 【住所又は居所】 大阪府高石市羽衣 2 丁目 4 - 3 3
 【氏名又は名称】 前田 和久
【代理人】
 【識別番号】 100078282
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山本 秀策
【選任した代理人】
 【識別番号】 100062409
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 安村 高明
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113413
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森下 夏樹
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 001878
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

フィーダー細胞として用いるための、脂肪組織に由来する細胞。

【請求項 2】

前記フィーダー細胞は、胚性幹細胞、組織幹細胞または分化細胞を分化または維持するためのものである、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記フィーダー細胞は、表皮への分化または維持をさせるためのものである、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 4】

前記フィーダー細胞は、角膜への分化または維持をさせるためのものである、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記細胞は、組織幹細胞を含む、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記細胞は、線維芽細胞を含む、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 7】

前記細胞は、初代培養細胞を含む、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記細胞は、ヒト細胞を含む、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 9】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法であって：

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；および

B) 該一部または該幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程、
を包含する、方法。

【請求項 10】

前記所望の臓器、組織または細胞は、表皮系のものを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記所望の臓器、組織または細胞は、角膜、骨、筋肉、軟骨、心臓、心膜、血管、皮膚、腎臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、関節、四肢末梢、脂肪および網膜ならびにその一部からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記フィーダー細胞は、組織幹細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記フィーダー細胞は、線維芽細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

前記フィーダー細胞は、初代培養細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

前記被検体と前記フィーダー細胞とは、同じ種である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

前記被検体はヒトであり、前記フィーダー細胞はヒト細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 17】

前記培養は、エキソビボで行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 18】

前記一部または前記幹細胞と、前記フィーダー細胞とは、異種、同種異系または同系である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 19】

前記一部または前記幹細胞と、前記フィーダー細胞とは、同系である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記一部または前記幹細胞は、被検体から摘出されてすぐのものであるか、または凍結保存されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記培養は、ウシ胎仔血清、インスリンおよびコレラトキシンからなる群より選択される少なくとも 1 つの因子の存在下で行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記培養は、前記一部または前記幹細胞と、前記フィーダー細胞との比率を、10 : 1 ~ 1 : 10 の比率で行うことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記培養は、前記一部または前記幹細胞より、前記フィーダー細胞を少なくして行うことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記培養は、細胞生理活性物質を含む培養液において行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記培養は、上皮増殖因子 (EGF) を含む培養液において行われ、前記所望の臓器、組織または細胞は、角膜またはその組織もしくは細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記フィーダー細胞の増殖を抑制する工程、をさらに包含する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記フィーダー細胞の増殖抑制は、抗生物質の投与または放射線照射によって達成される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗生物質は、マイトマイシン C を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するためのシステムであって：

A) 容器；

B) 脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞、
を備える、システム。

【請求項 3 0】

所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供するための提供手段をさらに備える、請求項 2 9 に記載のシステム。

【請求項 3 1】

前記提供手段は、前記一部または前記幹細胞を、前記被検体から取り出すための手段を包含する、請求項 3 0 に記載のシステム。

【請求項 3 2】

前記手段は、カテーテル、かきとり棒、ピンセット、注射器、医療用はさみおよび内視鏡からなる群より選択される手段を包含する、請求項 3 1 に記載のシステム。

【請求項 3 3】

細胞生理活性物質をさらに備える、請求項 2 9 に記載のシステム。

【請求項 3 4】

EGF をさらに備える、請求項 2 9 に記載のシステム。

【請求項 3 5】

前記フィーダー細胞の増殖を抑制する手段、をさらに包含する、請求項 2 9 に記載のシステム。

【請求項 3 6】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって：

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程

;

B) 該一部または該幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程; および

C) 該培養された該一部または該幹細胞を該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

【請求項 37】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、および脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞を、該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

【請求項 38】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、および脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞、
を含む、医薬。

【請求項 39】

フィーダー細胞としての、脂肪組織に由来する細胞の使用。

【請求項 40】

フィーダー細胞を含む医薬を製造するための、脂肪組織に由来する細胞の使用。

【請求項 41】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を製造するための、脂肪組織に由来する細胞の使用。

【請求項 42】

フィーダー細胞として用いるための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞。

【請求項 43】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程;
および

B) 該一部または該幹細胞を、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程、
を包含する、方法。

【請求項 44】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するためのシステムであって:

A) 容器;

B) ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞、
を備える、システム。

【請求項 45】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程;
;

B) 該一部または該幹細胞を、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程; および

C) 該培養された該一部または該幹細胞を該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

【請求項 46】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、およびヒト線

維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞を、該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

【請求項 47】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬であって：

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、およびヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞、
を含む、医薬。

【請求項 48】

フィーダー細胞としての、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用。

【請求項 49】

フィーダー細胞を含む医薬を製造するための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用。

【請求項 50】

被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を製造するための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用。

【書類名】明細書

【発明の名称】再生治療システム

【技術分野】

【0001】

本発明は、再生医療の分野にある。より詳細には、本発明は、臓器、組織および細胞を再生および維持するための技術に関する。本発明はまた、本発明の技術を利用した再生治療方法およびシステムを提供する。

【背景技術】

【0002】

再生医療は、近年頃に研究が進展し、その可能性が注目されている。その材料として利用される胚性幹（ES）細胞は、マウス由来のSTO細胞株またはマウス胎児から調製したマウス初代培養繊維芽細胞などのフィーダー細胞層上で培養することが必須とされている。このようなマウス初代培養細胞は、マウスの他、他の種の幹細胞を支持することも知られている。

【0003】

再生医療には種々の分野があるが、そのような再生医療分野において、現在もっとも脚光を浴びているプロジェクトの一つが角膜再生医療である。従来、ヒトの再生治療では、体外で異種細胞であるマウス繊維芽細胞を用いる必要があり、臨床導入の大きな壁となっている。なぜなら、現在の角膜再生医療では異種動物細胞をフィーダー細胞として用いざるを得ないからである。この場合の移植組織の臨床観察期間はFDAの指針として20年と決められているが、このような基準は実際の医療への応用を考えた場合、実務的ではない。

【0004】

一方、脂肪にも幹細胞があることが分かってきた（特許文献1～2）。脂肪にある幹細胞は、他の組織（例えば、骨髄）に比べて、その供給源が豊富であり、存在率も多いようであることから、その利用が注目されている。しかし、幹細胞自身を再生治療における支持体またはフィーダーとして使用するという発想は報告されていない。

【0005】

ヒトでの治療には、ヒトに由来する細胞または細胞成分を利用することが好ましいが、ヒトに由来する細胞をフィーダー細胞として用いた例で首尾よくいくという報告はほとんどない。従来、ヒトに由来する細胞から樹立された細胞株を用いる場合は、フィーダーとしての効率が悪いともいわれており、ヒト由来の細胞は、有効なフィーダー細胞として使用できないと予測されている。

【0006】

例えば、特許文献3では、ヒトES細胞を培養するためのフィーダー細胞として、ヒト由来間葉系幹細胞または繊維芽細胞の細胞株を記載する。この細胞は、多能性幹細胞（ES細胞）から分化し不死化させた細胞株であり、悪性ではないようである。しかし、そのフィーダー効率は低い。特許文献4では、ヒト造血性前駆細胞を培養するためのフィーダー細胞が記載される。しかし、この細胞は、細胞株化されたヒト由来ストローマ細胞であり、これは骨髄ストローマHS-5であると記載されている。この細胞は、LIF、KL、MIP1 α 、IL-6を分泌すると言われている。特許文献5は、主に血液細胞を培養するためのフィーダー細胞L87/4あるいはL88/5を記載する。この細胞は、ヒト骨髄ストローマ細胞に放射線照射し不死化し細胞株化したものであり、この放射線照射骨髄ストローマ細胞はG-CSF、IL-6の発現が増大している。特許文献6は、ヒトES細胞を培養するためのフィーダー細胞を記載する。このフィーダー細胞はヒト・成体/胎児/胚性細胞あるいはこれらの組み合わせであり、さらに繊維芽細胞/皮膚細胞/筋肉組織中の繊維芽細胞/上皮細胞あるいはこれらの組み合わせであると記載されている。しかし、これらはみな細胞株化されており、フィーダー細胞はさらにファロピーオ管繊維芽細胞のような物を含むようである。特許文献6では、フィーダー細胞はまず初期培養時にHFE培地で培養し、確立し、その後、さらに続いてHM培地で培養し、増殖させ、細胞

株化させたものである (Detroit 551、MRC-5、WI-38)。

【0007】

とはいうものの、ヒト由来の細胞をフィーダー細胞などの再生治療に必要な成分として使用することが好ましいことは万人が感ずるところで、特にエキソビボでもフィーダー細胞として使用することができるヒト由来の細胞の登場が待たれている。

【特許文献1】 WO03/022988

【特許文献2】 WO00/53795

【特許文献3】 米国特許公開 2002-0072117

【特許文献4】 米国特許公開 2002-197717

【特許文献5】 W09502040

【特許文献6】 米国特許公開 2003-143736

【非特許文献1】 幹細胞・クローン 研究プロトコール 中辻編、羊土社 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、細胞を用いて効率よく、有効に再生医療に活かせる技術を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明のシステムは、脂肪組織由来の細胞がフィーダー細胞として利用することができる点を見出したことによって達成される。別の局面では、ヒト由来の線維芽細胞にて上記課題を解決した。好ましい実施形態では、本発明のシステムでは、自己細胞を用いることができ、きわめて有効かつ汎用性の高い治療法であるといえる。従って、本発明は、以下を提供する。

(1) フィーダー細胞として用いるための、脂肪組織に由来する細胞。

(2) 上記フィーダー細胞は、胚性幹細胞、組織幹細胞または分化細胞を分化または維持するためのものである、項目1に記載の細胞。

(3) 上記フィーダー細胞は、表皮への分化または維持をさせるためのものである、項目1に記載の細胞。

(4) 上記フィーダー細胞は、角膜への分化または維持をさせるためのものである、項目1に記載の細胞。

(5) 上記細胞は、組織幹細胞を含む、項目1に記載の細胞。

(6) 上記細胞は、線維芽細胞を含む、項目1に記載の細胞。

(7) 上記細胞は、初代培養細胞を含む、項目1に記載の細胞。

(8) 上記細胞は、ヒト細胞を含む、項目1に記載の細胞。

(9) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法であって：

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；および

B) 上記一部または上記幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程、
を包含する、方法。

(10) 上記所望の臓器、組織または細胞は、表皮系のものを含む、項目9に記載の方法。

(11) 上記所望の臓器、組織または細胞は、角膜、骨、筋肉、軟骨、心臓、心膜、血管、皮膚、腎臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、関節、四肢末梢、脂肪および網膜ならびにその一部からなる群より選択される、項目9に記載の方法。

(12) 上記フィーダー細胞は、組織幹細胞を含む、項目9に記載の方法。

(13) 上記フィーダー細胞は、線維芽細胞を含む、項目9に記載の方法。

- (14) 上記フィーダー細胞は、初代培養細胞を含む、項目9に記載の方法。
- (15) 上記被検体と上記フィーダー細胞とは、同じ種である、項目9に記載の方法。
- (16) 上記被検体はヒトであり、上記フィーダー細胞はヒト細胞である、項目9に記載の方法。
- (17) 上記培養は、エキソビボで行われる、項目9に記載の方法。
- (18) 上記一部または上記幹細胞と、上記フィーダー細胞とは、異種、同種異系または同系である、項目9に記載の方法。
- (19) 上記一部または上記幹細胞と、上記フィーダー細胞とは、同系である、項目9に記載の方法。
- (20) 上記一部または上記幹細胞は、被検体から摘出されてすぐのものであるか、または凍結保存されたものである、項目9に記載の方法。
- (21) 上記培養は、ウシ胎仔血清、インスリンおよびコレラトキシンからなる群より選択される少なくとも1つの因子の存在下で行われる、項目9に記載の方法。
- (22) 上記培養は、上記一部または上記幹細胞と、上記フィーダー細胞との比率を、10:1~1:10の比率で行うことを特徴とする、項目9に記載の方法。
- (23) 上記培養は、上記一部または上記幹細胞より、上記フィーダー細胞を少なくして行うことを特徴とする、項目9に記載の方法。
- (24) 上記培養は、細胞生理活性物質を含む培養液において行われる、項目9に記載の方法。
- (25) 上記培養は、上皮増殖因子(EGF)を含む培養液において行われ、上記所望の臓器、組織または細胞は、角膜またはその組織もしくは細胞を含む、項目9に記載の方法。
- (26) 上記フィーダー細胞の増殖を抑制する工程、をさらに包含する、項目9に記載の方法。
- (27) 上記フィーダー細胞の増殖抑制は、抗生物質の投与または放射線照射によって達成される、項目26に記載の方法。
- (28) 上記抗生物質は、マイトマイシンCを含む、項目27に記載の方法。
- (29) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するためのシステムであって：
A) 容器；
B) 脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞、を備える、システム。
- (30) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供するための提供手段をさらに備える、項目29に記載のシステム。
- (31) 上記提供手段は、上記一部または上記幹細胞を、上記被検体から取り出すための手段を包含する、項目30に記載のシステム。
- (32) 上記手段は、カテーテル、かきとり棒、ピンセット、注射器、医療用はさみおよび内視鏡からなる群より選択される手段を包含する、項目31に記載のシステム。
- (33) 細胞生理活性物質をさらに備える、項目29に記載のシステム。
- (34) EGFをさらに備える、項目29に記載のシステム。
- (35) 上記フィーダー細胞の増殖を抑制する手段、をさらに包含する、項目29に記載のシステム。
- (36) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって：
A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；
B) 上記一部または上記幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程；および
C) 上記培養された上記一部または上記幹細胞を上記被検体の処置されるべき部位に移植する工程、を包含する、方法。
- (37) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって：

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、および脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞を、上記被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

(38) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、および脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞、
を含む、医薬。

(39) フィーダー細胞としての、脂肪組織に由来する細胞の使用。

(40) フィーダー細胞を含む医薬を製造するための、脂肪組織に由来する細胞の使用。

(41) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を製造するための、脂肪組織に由来する細胞の使用。

(42) フィーダー細胞として用いるための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞。

(43) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程;
および

B) 上記一部または上記幹細胞を、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程、
を包含する、方法。

(44) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するためのシステムであって:

A) 容器;

B) ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞、
を備える、システム。

(45) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程;

B) 上記一部または上記幹細胞を、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程;および

C) 上記培養された上記一部または上記幹細胞を上記被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

(46) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、およびヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞を、上記被検体の処置されるべき部位に移植する工程、
を包含する、方法。

(47) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬であって:

A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、およびヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞、
を含む、医薬。

(48) フィーダー細胞としての、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用。

(49) フィーダー細胞を含む医薬を製造するための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用。

(50) 被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を製造するための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用。

【0010】

従って、本発明のこれらおよび他の利点は、添付の図面を参照して、以下の詳細な説明を読みかつ理解すれば、当業者には明白になることが理解される。

【発明の効果】

【0011】

豊富に入手可能なソースを用いて再生治療システムが提供される。このような効果は、従来達成できなかった効果である。好ましい実施形態では、本発明は、自己由来の角膜を体外培養し移植するものである。したがって、この好ましい実施形態では、本システムを用いれば、自己の細胞を有効かつ簡易に使用できるので、こうした懸案事項はなくなる。しかも免疫拒絶反応が皆無である点など、従来ある再生医療の技術自体の汎用性を飛躍的に増大させる。角膜再生医療の細胞ソースとして、倫理的社会的なニーズは極めて多い。更に、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を使用する場合、本システムを用いれば、懸念されたFDAの作った細胞治療指針もクリアーでき、その効果は計り知れない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0013】

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0014】

本明細書において「臓器」と「器官」(organ)とは、互換的に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、関節、骨、軟骨、筋肉、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。このような臓器または器官はまた、表皮系、脾実質系、脾管系、肝系、血液系、心筋系、骨格筋系、骨芽系、骨格筋芽系、神経系、血管内皮系、色素系、平滑筋系、脂肪系、骨系、軟骨系などの器官または臓器が挙げられるがそれらに限定されない。

【0015】

本明細書において「免疫反応」とは、移植片と宿主との間の免疫寛容の失調による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応（移植後数分以内）（ β -Galなどの抗体による免疫反応）、急性拒絶反応（移植後約7～21日の細胞性免疫による反応）、慢性拒絶反応（3カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応）などが挙げられる。

【0016】

本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中への細胞（免疫系）浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

【0017】

本明細書において「組織」(tissue)とは、細胞生物において、同一の機能・形態をもつ細胞集団をいう。多細胞生物では、通常それを構成する細胞が分化し、機能が専能化し、分業化がおこる。従って細胞の単なる集合体であり得ず、ある機能と構造を備えた有機的細胞集団、社会的細胞集団としての組織が構成されることになる。組織としては、外皮組織、結合組織、筋組織、神経組織などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の組織は、生物のどの臓器または器官由来の組織でもよい。本発明の好ましい実施形態では、本発明が対象とする組織としては、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、角膜、関節、軟骨および骨の組織が挙げられるがそれらに限定されない。

【0018】

本明細書において「脂肪組織」とは、脂肪の貯蔵組織の総称である。疎性結合組織のうち、特に脂肪細胞の多いもの、皮下脂肪組織などがある。各脂肪細胞は格子繊維によって囲まれ、細胞間に毛細血管が密に分布し、脂肪体を形成することがおおい。本明細書では、どのような脂肪組織も供給源とすることができる。脂肪体は、他の組織から独立してほぼ一定した塊状もしくは房状の脂肪組織であり、脊椎動物では腎臓や生殖腺に接して腹腔内に存在する。白色、黄色または橙色をしていることが多い。

【0019】

本明細書において「膜状組織」とは、「平面状組織」ともいい、膜状の組織をいう。膜状組織には、心膜、硬膜、角膜などの器官の組織または袋状組織の一定面積部分の組織などが挙げられる。

【0020】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本発明の方法においては、どのような細胞でも対象とされ得る。本発明で使用される「細胞」の数は、光学顕微鏡を通じて計数することができる。光学顕微鏡を通じて計数する場合は、核の数を数えることにより計数を行う。当該組織を組織切片スライスとし、ヘマトキシリン-エオシン（HE）染色を行うことにより細胞外マトリクス（例えば、エラスチンまたはコラーゲン）および細胞に由来する核を色素によって染め分ける。この組織切片を光学顕微鏡にて検鏡し、特定の面積（例えば、 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ ）あたりの核の数を細胞数と見積って計数することができる。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞）であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。また、このような供給源をそのまま細胞として用いることもできる。

【0021】

本発明において使用される細胞は、脂肪細胞またはその対応物がある限り、どの生物由来の細胞（例えば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）でも用いることができる。好ましくは、そのような細胞は、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）由来の細胞が用いられる。1つの実施形態では、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞、特にヒト由来の細胞が用いられるがそれに限定されない。

【0022】

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）（「*pluripotency*」）を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹（ES）細胞または組織幹細胞（組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう）であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞（たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など）もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核/細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは間葉系幹細胞のような

組織幹細胞であり得るが、状況に応じて胚性幹細胞も使用され得る。

【0023】

本明細書において幹細胞というときは、幹細胞を少なくとも一定量含む組織集合物をさすことが理解される。したがって、本明細書では、幹細胞は、例えば、コラゲナーゼ処理して脂肪組織から採取した幹細胞（実施例において使用される幹細胞など）を用いることができるがそれらに限定されない。

【0024】

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵（共通）幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

【0025】

本明細書において「脂肪幹細胞」とは、脂肪組織に由来する幹細胞をいう。このような幹細胞の分離方法の一部は公知であり、例えば、非特許文献1などに記載される方法を利用して分離することができる。これらの文献に記載された事項は、本明細書において特に関連する場所が参考として援用される。あるいは、脂肪幹細胞は、WO00/53795；WO03/022988；WO01/62901；Zuk, P. A., et al., Tissue Engineering, Vol. 7, 211-228, 2001；Zuk, P. A., et al., Molecular Biology of the Cell Vol., 13, 4279-4295, 2002などに記載される方法またはその改変を利用して調製することができる。具体的には、例えば、（1）脂肪吸引物を分液漏斗を用いて生理食塩水で十分に洗浄し；（2）上層に脂肪吸引物、下層に生理食塩水が十分に分離したのを確認し、下層を捨てる。肉眼で見て生理食塩水がほぼ透明になるまでこれを繰り返し；（3）脂肪吸引物と同量の0.075%コラゲナーゼ/PBSを加え、37℃でよく攪拌しながら30分間インキュベートし；（4）上記の試料に等量の10%血清加DMEMを加え；（5）上記の試料を1200gで10分間遠心分離し；（6）ペレットに0.16M NH₄Cl/PBSを加えて懸濁し、室温で適宜（例えば、10～15分間）インキュベートし；（7）上記の試料を口径100μmのメッシュを用いて吸引ろ過し；および（8）ろ過物を1200gで5分間遠心分離することによって調製することができる。ここで、調製量に応じて、上記プロトコールをスケールアップまたはスケールダウンすることは、当業者の技術範囲内である。

【0026】

本明細書において、このような脂肪幹細胞を同定する方法としては、例えば、細胞マーカー、細胞が分泌するサイトカインの特性などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0027】

そのような細胞マーカーとしては、例えば、CD4、CD13、CD34、CD36、CD49d、CD71、CD90、CD105、CD117、CD151；あるいは、CD105、CD73、CD29、CD44およびSc α 1からなる群より選択される細胞表面マーカーが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、間葉系幹細胞の表面抗原は、CD105（+）、CD73（+）、CD29（+）、CD44（+）、CD14（-）、CD34（-）、CD45（-）であるとされており、少なくともこのいずれか一つ、好ましくはその2以上、より好ましくはそのすべての性質を示す細胞が本発明において使用される細胞として好ましいことが理解される。

【0028】

本発明において用いられる脂肪幹細胞の分泌サイトカインとしては、VEGF、LIF、Litr α リガンド、MIP1 α （ケモカイン）、IL-6、G-CSF、FGF、IGFなどが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では特に、フィーダー細胞として使用することができる特定の細胞群がVEGFを大量に発現し、分泌していることが見出されている。従って、理論に束縛されることは望まないものの、本発明の再生治療システムにおいてフィーダー細胞として使用するための細胞としては、このようにVEGFを大量に

分泌することができる細胞を用いることが好ましくあり得る。このような VEGF のようなサイトカインを分泌する細胞は、初代培養細胞として組織から分離してもよく、あるいは、遺伝子操作によってそのサイトカインをコードする核酸配列を含む核酸分子を細胞に移入（例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなど）することによって得ることができ、本発明では、そのような遺伝子改変細胞もまた使用することができることが理解されるべきである。

【0029】

本明細書において「線維芽細胞」とは、支持組織の繊維成分を供給し、繊維性結合組織の重要な成分をなす細胞をいう。組織切片図では、扁平で長目の外形をもち、不規則な突起を示すことが多い。細胞質は、ミトコンドリア、ゴルジ体、中心体、小脂肪球などを含むが、そのほかに特殊な分化は示さない。核は楕円形をしており、しばしば膠原繊維に密接して存在する。脂肪組織から分離された線維芽細胞は、幹細胞をよく含むといわれている。

【0030】

本発明において用いられる細胞は、通常異種であり、異種である状態で用いられることが理解されるべきである。

【0031】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、その DNA を次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

【0032】

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、腭実質細胞、腭管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。本発明において用いられる場合、分化細胞は、集団または組織の形態であってもよい。

【0033】

従って、本明細書において「分化」とは、一般的には、1 つの系が 2 つ以上の質的に異なる系に分離することをいい、細胞、組織または臓器について用いられるとき、機能および／または形態が特殊化することをいう。分化に伴い、通常、多能性は減少または消失する。

【0034】

本明細書において「分化因子」とは、「分化促進因子」ともいい、分化細胞への分化を促進することが知られている因子（例えば、化学物質、温度など）であれば、どのような因子であってもよい。そのような因子としては、例えば、種々の環境要因を挙げることができ、そのような因子としては、例えば、温度、湿度、pH、塩濃度、栄養、金属、ガス、有機溶媒、圧力、化学物質（例えば、ステロイド、抗生物質など）などまたはそれらの任意の組み合わせが挙げられるがそれらに限定されない。代表的な分化因子としては、細胞生理活性物質が挙げられるがそれらに限定されない。そのような因子のうち代表的なものとしては、DNA 脱メチル化剤（5-アザシチジンなど）、ヒストン脱アセチル化剤（トリコスタチンなど）、核内レセプターリガンド（例えば、レチノイン酸（ATRA）、ビタミン D₃、T₃ など）、細胞増殖因子（アクチビン、IGF-1、FGF、PDGF、TGF- β 、BMP 2/4 など）、サイトカイン（LIF、IL-2、IL-6 など）、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ジメチルアセトアミド、ジブチル cAMP、ジメチオルスルホキシド、ヨードデオキシウリジン、ヒドロキシル尿素、シトシンアラビノシド、マイトマイシン C、酪酸ナトリウム、アフィディコリン、フルオロデオキシウリジン、ポリブレン、セレンなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0035】

本明細書において「細胞生理活性物質」または「生理活性物質」(physiologically active substance)とは、細胞または組織に作用する物質をいう。そのような作用としては、例えば、その細胞または組織の制御、変化などが挙げられるがそれに限定されない。生理活性物質には、サイトカインおよび増殖因子が含まれる。生理活性物質は、天然に存在するものであっても、合成されたものでよい。好ましくは、生理活性物質は、細胞が産生するものまたはそれと同様の作用を有するものであるが改変された作用を持つものであってもよい。本明細書では、生理活性物質はタンパク質形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

【0036】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制御作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

【0037】

本明細書において用いられる「増殖因子」または「細胞増殖因子」とは、本明細書では互換的に用いられ、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。

【0038】

サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝実質細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)のような増殖活性を有するものが挙げられる。

【0039】

サイトカインおよび増殖因子などの生理活性物質は一般に、機能重複現象(redundancy)があることから、他の名称および機能(例えば、細胞接着活性または細胞-基質間の接着活性など)で知られるサイトカインまたは増殖因子であっても、本発明に使用される生理活性物質の活性を有する限り、本発明において使用され得る。また、サイトカインまたは増殖因子は、本明細書における好ましい活性(例えば、所望の分化を誘導し得る活性)を有してさえいれば、本発明の好ましい実施形態において使用することができる。

【0040】

具体的な分化因子としては、以下が挙げられる。これらの分化因子は、単独でまたは組み合わせて用いられ得る。

【0041】

- A) 角膜: 上皮増殖因子(EGF);
- B) 皮膚(ケラチノサイト): TGF- β 、FGF-7 (KGF: keratinocyte growth factor)、EGF
- C) 血管内皮: VEGF、FGF、アンギオポエチン(angiopoietin)
- D) 腎臓: LIF、BMP、FGF、GDNF
- E) 心臓: HGF、LIF、VEGF
- F) 肝臓: HGF、TGF- β 、IL-6、EGF、VEGF
- G) 臍帯内皮: VEGF
- H) 腸管上皮: EGF、IGF-I、HGF、KGF、TGF- β 、IL-11

- I) 神経: 神経成長因子 (NGF)、BDNF (脳由来神経栄養因子)、GDNF (グリア細胞由来神経栄養因子)、ニューロトロフィン (neurotrophin)、IL-6、TGF- β 、TNF
- J) グリア細胞: TGF- β 、TNF- α 、EGF、LIF、IL-6
- K) 末梢神経細胞: bFGF、LIF、TGF- β 、IL-6、VEGF、
- L) 肺 (肺胞上皮): TGF- β 、IL-13、IL-1 β 、KGF、HGF
- M) 胎盤: 成長ホルモン (GH)、IGF、プロラクチン、LIF、IL-1、アクチビンA、EGF
- N) 脾臓上皮: 成長ホルモン、プロラクチン
- O) 脾臓ランゲルハンス氏島細胞: TGF- β 、IGF、PDGF、EGF、TGF- β 、TRH (thyrotropin)
- P) 関節滑膜上皮: FGF、TGF- β
- Q) 骨芽細胞: BMP、FGF
- R) 軟骨芽細胞: FGF、TGF- β 、BMP、TNF- α
- S) 網膜細胞: FGF、CNTF (絨毛神経栄養因子 = ciliary neurotrophic factor)
- T) 脂肪細胞: インスリン、IGF、LIF
- U) 筋肉細胞: LIF、TNF- α 、FGF。

【0042】

本明細書において「維持」とは、細胞、組織または臓器について用いられるとき、その機能および／または形態を実質的に保持させることをいう。例えば、角膜の維持とは、被検体が通常有すべき角膜の機能および／または形態を実質的に損傷しないですることを行い、機能としては、視力の維持、形態としては、外観の保持が挙げられるがそれに限定されない。

【0043】

本明細書において使用される「再生」(regeneration)とは、個体の組織または臓器の一部が失われた際に、欠如した組織が補填されて復元される現象をいう。動物種間または同一個体における組織種に応じて、再生のその程度および様式は変動する。ヒト組織の多くはその再生能が限られており、大きく失われると完全再生は望めない。大きな傷害では、失われた組織とは異なる増殖力の強い組織が増殖し、不完全に組織が再生され機能が回復できない状態で終わる不完全再生が起こり得る。この場合には、生体内吸収性材料からなる構造物を用いて、組織欠損部への増殖力の強い組織の侵入を阻止することで本来の組織が増殖できる空間を確保し、さらに細胞増殖因子を補充することで本来の組織の再生能力を高める再生医療が行われている。この例として、軟骨、骨および末梢神経の再生医療がある。神経細胞および心筋は再生能力がないかまたは著しく低いとこれまでは考えられてきた。近年、これらの組織へ分化し得る能力および自己増殖能を併せ持った組織幹細胞 (体性幹細胞) の存在が報告され、組織幹細胞を用いる再生医療への期待が高まっている。

【0044】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞およびその分化細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞およびその分化細胞、造血幹細胞およびその分化細胞ならびに間葉系幹細胞およびその分化細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞およびその分化細胞、脾幹細胞およびその分化細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような胚葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、間葉系由来の細胞が使用され得る。

【0045】

本明細書において「フィーダー層」または「フィーダー細胞」(feeder layer または feeder cell)とは、互換可能に用いられ、培養基質に設けられる、単独では培養維持することのできない細胞種の増殖および／または分化形質発現を可

能にするような、他の細胞種による支持細胞層をいう。組織細胞のには、通常の細胞培養条件下では、分化形質発現はもとより増殖すらできない細胞種も多いといわれており、そのような細胞としては、例えば、ある種の幹細胞（特に、胚性幹細胞、造血幹細胞など）、角膜、表皮などが挙げられるがそれらに限定されない。これらの細胞種は一般に、栄養要求性が高く特異的な増殖因子、分化誘導因子を必要とするとされる。このような細胞種でも生体内でのその細胞種の支持細胞あるいはそれと類似の細胞が形成する特定の細胞の層を培養基質に活用することで、培養される細胞種が要求する因子および／または栄養源が供給されることによって、増殖および分化をするようになるといわれている。フィーダー細胞として用いる細胞種は、対象となる細胞種によって選択されるが、抗生物質投与（例えば、マイトマイシンCなど）、UV照射などの方法で細胞増殖を抑制して用いることが多い。生殖細胞、初期胚細胞、造血幹細胞などの培養が可能になったのは、フィーダー層の活用に関与するところが大きいとされている。

【0046】

本明細書において「初代培養細胞」とは、体から分離した細胞、組織、器官などを植え込み、第1回目の継代を行うまでの培養の状態にある細胞をいう。

【0047】

本発明の細胞は、細胞の維持または所望の分化細胞へ分化する限り、任意の培養液を用いることができる。そのような培養液としては、例えば、DMEM、P199、MEM、HBSS、Ham's F12、BME、RPMI1640、MCDB104、MCDB153（KGM）およびそれらの混合物などが挙げられるがそれらに限定されない。このような培養液には、デキサメタゾンなどの副腎皮質ステロイド、インスリン、グルコース、インドメタシン、イソブチルメチルキサンチン（IBMX）、アスコルベート-2-ホスフェート、アスコルビン酸およびその誘導体、グリセロホスフェート、エストロゲンおよびその誘導体、プロゲステロンおよびその誘導体、アンドロゲンおよびその誘導体、aFGF、bFGF、EGF、IGF、TGF β 、ECGF、BMP、PDGFなどの増殖因子、下垂体エキス、松果体エキス、レチノイン酸、ビタミンD、甲状腺ホルモン、ウシ胎仔血清、ウマ血清、ヒト血清、ヘパリン、炭酸水素ナトリウム、HEPES、アルブミン、トランスフェリン、セレン酸（亜セレン酸ナトリウムなど）、リノレン酸、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5-アザンシチジンなどの脱メチル化剤、トリコスタチンなどのヒストン脱アセチル化剤、アクチビン、LIF・IL-2・IL-6などのサイトカイン、ヘキサメチレンビスアセトアミド（HMBA）、ジメチルアセトアミド（DMA）、ジブチルcAMP（dbcAMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヨードデオキシウリジン（IdU）、ヒドロキシウレア（HU）、シトシンアラビノシド（AraC）、マイトマイシンC（MMC）、酪酸ナトリウム（NaBu）、ポリブレン、セレンウム、コレラトキシンなどを1つまたはその組み合わせとして含ませておいてもよい。

【0048】

本発明では、培養には、好ましくは、温度培養皿を用いることが有利であり得る。細胞の分離が容易であるからである。温度培養皿は、代表的には、温度応答性高分子がコーティングされたものをいう。温度培養皿は、セルシード（東京、日本）などから市販されているものを利用することができる。

【0049】

本明細書において「温度応答性高分子」とは、温度に应答して、その形状および／または性質を変化させる性質を有する高分子をいう。温度応答性高分子としては、例えば、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-メチルメタクリレート）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸ナトリウム）共重合体、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-ビニルフェロセン）共重合体、 γ 線照射したポリ（ビニルメチルエーテル）および上記高分子に対して架橋剤によって架橋し作製したゲルなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、例えば、ポリ（N-イソプロピ

ルアクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-メチルメタクリレート)共重合体、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-アクリル酸ナトリウム)共重合体および上記高分子に対して架橋剤によって架橋し作製したゲルなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において使用される温度応答性高分子としては、例えば、水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が0~80℃であるものが挙げられるがそれらに限定されない。ここで、臨界溶解温度とは、形状および/または性質を変化させる閾値の温度をいう。本明細書では、好ましくは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)が使用され得る。

【0050】

例えば、 γ 線照射したポリビニルメチルエーテル水溶液は、室温では水和し膨潤しているが、温度が上がると脱水和して収縮する感熱性の高分子ゲルとなることが知られている。ゼリーのように均質透明なPVMEゲルを温めると白濁し透明性が変化する。多孔質構造のゲルを調製したり、繊維または粒子などの小さな形に成形すると高速で伸縮するようになる。このような多孔質構造をもつ繊維状PVMEゲルの場合、伸縮速度は1秒未満という速さであるといわれる(<http://www.aist.go.jp/NIMC/overview/v27-j.html>、特開2001-213992号および特開2001-131249号参照)。N-イソプロピルアクリルアミドゲル(すなわち、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド))もまた、温度応答性ゲルとして知られる。ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)に対して、疎水性のモノマーを共重合させると、形状および/または性質が変化する温度を低下させることができ、親水性のモノマーを共重合させると形状および/または性質が変化する温度を上げることができる。これを利用して、所望の刺激に応答した充填剤を調製することができる。このような手法は、他の温度応答性高分子に対しても適用することができる。

【0051】

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質(例えば、多分化能)を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。樹立された分化細胞は、特定の確定した機能を有する。樹立された分化細胞は癌化していることが多いが、それに限定されない。

【0052】

本明細書において「生体内」または「インビボ」(*in vivo*)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする組織または器官が配置されるべき位置をいう。

【0053】

本明細書において「インビトロ」(*in vitro*)とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」(例えば、試験管内に)摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

【0054】

本明細書において「エキソビボ」とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より抽出し、インビトロで治療遺伝子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソビボという。

【0055】

本明細書において自己または自家とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する個体またはその一部(例えば、細胞、組織、臓器など)をいう。本明細書において自己というときは、広義には遺伝的に同じ他個体(例えば一卵性双生児)からの移植片をも含み得る。

【0056】

本明細書において同種(同種異系)とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される個体またはその一部(例えば、細胞、組織、臓器など)をいう。遺伝的に異なることから、同種異系のものは、移植された個体(レシピエント)において免疫反応を惹起し得る。そのような細胞などの例としては、親由来の細胞などが挙げられるがそれらに

限定されない。

【0057】

本明細書において異種とは、異種個体から移植されるものをいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ブタからの移植物は異種移植物という。

【0058】

本明細書において「レシピエント」（受容者）とは、移植される細胞などを受け取る個体といい、「宿主」とも呼ばれる。これに対し、移植される細胞などを提供する個体は、「ドナー」（供与者）という。レシピエントとドナーとは同じであっても異なってもよい。

【0059】

本発明で使用される細胞は、同系由来（自己（自家）由来）でも、同種異系由来（他個体（他家）由来）でも、異種由来でもよい。拒絶反応が考えられることから、自己由来の細胞が好ましいが、拒絶反応が問題でない場合同種異系由来であってもよい。

【0060】

本明細書において「移植」とは、本発明の細胞、組成物、医薬などを、単独で、または他の治療剤と組み合わせて体内に移入することを意味する。本発明は、以下のような治療部位（例えば、骨などなど）への導入方法、導入形態および導入量が使用され得る：本発明の医薬などの障害部位への直接注入し、貼付後に縫合し、挿入する等の方法があげられる。本発明の脂肪幹細胞と、分化細胞との組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、分化促進因子）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与または移植は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる細胞、医薬、化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0061】

本発明の方法が対象とし得る疾患、障害、状態は、臓器または組織の再生が所望される任意の疾患、障害、状態を含む。本発明は特に、フィーダー細胞がなければ再生し得ない臓器、組織または細胞に関連する疾患、障害、状態が対象として特に有利である。

【0062】

1つの実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、眼科疾患または障害であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、円錐角膜、スチーブンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘡、熱・化学外傷眼、再発翼状片、遷延性角膜上皮欠損、角膜穿孔、角膜周辺部潰瘍、エキシマレーザー治療後の角膜上皮剥離などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0063】

1つの実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、上皮関連の疾患または障害であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、皮膚疾患、腸疾患、気道疾患、口腔疾患、膀胱疾患、卵管疾患、角膜疾患などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0064】

1つの実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、循環器系（血液細胞など）であり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重症再生不良性貧血）、腎性貧血、癌性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、癌または腫瘍（例えば、白血病）およびその化学療法処置後の造血不全、血小板減少症、急性骨髄性白血病（特に、第1寛解期（High-risk群）、第2寛解期以降の寛解期）、急性リンパ性白血病（特に、第1寛解期、第2寛解期以降の寛解期）、慢性骨髄性白血病（特に、慢性期、移行期）、悪性リンパ腫（特に、第1寛解期（High-risk群）、第2寛解期以降の寛解期）、多発性骨髄腫（特に、発症後早期）；心不全、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心筋・心膜疾患、先天性心疾患（たとえば、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、ファロー四徴）、動脈疾患（たとえば、動脈硬

化、動脈瘤)、静脈疾患(たとえば、静脈瘤)、リンパ管疾患(たとえば、リンパ浮腫)が挙げられるがそれらに限定されない。

【0065】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、神経系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、痴呆症、脳卒中およびその後遺症、脳腫瘍、脊髄損傷が挙げられるがそれらに限定されない。

【0066】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、免疫系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、T細胞欠損症、白血病が挙げられるがそれらに限定されない。

【0067】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、運動器・骨格系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、骨折、骨粗鬆症、関節の脱臼、亜脱臼、捻挫、靱帯損傷、変形性関節症、骨肉腫、ユーイング肉腫、骨形成不全症、筋ジストロフィー、骨軟骨異形成症が挙げられるがそれらに限定されない。

【0068】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、皮膚系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、無毛症、黒色腫、皮膚悪性リンパ腫、血管肉腫、組織球症、水疱症、膿疱症、皮膚炎、湿疹が挙げられるがそれらに限定されない。

【0069】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、内分泌系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、視床下部・下垂体疾患、甲状腺疾患、副甲状腺(上皮小体)疾患、副腎皮質・髄質疾患、糖代謝異常、脂質代謝異常、タンパク質代謝異常、核酸代謝異常、先天性代謝異常(フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症)、無アルブミン血症、アスコルビン酸合成能欠如、高ビリルビン血症、高ビリルビン尿症、カリクレイン欠損、肥満細胞欠損、尿崩症、パンプレッシン分泌異常、侏儒症、ウオルマン病(酸リパーゼ(Acid lipase)欠損症)、ムコ多糖症VI型が挙げられるがそれらに限定されない。

【0070】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、呼吸器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、肺疾患(例えば、肺炎、肺癌など)、気管支疾患が挙げられるがそれらに限定されない。

【0071】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、消化器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、食道疾患(たとえば、食道癌)、胃・十二指腸疾患(たとえば、胃癌、十二指腸癌)、小腸疾患・大腸疾患(たとえば、大腸ポリープ、結腸癌、直腸癌など)、胆道疾患、肝臓疾患(たとえば、肝硬変、肝炎(A型、B型、C型、D型、E型など)、劇症肝炎、慢性肝炎、原発性肝癌、アルコール性肝障害、薬物性肝障害)、脾臓疾患(急性脾炎、慢性脾炎、脾臓癌、嚢胞性脾疾患)、腹膜・腹壁・横隔膜疾患(ヘルニアなど)、ヒルシュスプラング病が挙げられるがそれらに限定されない。

【0072】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、泌尿器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、腎疾患(腎不全、原発性糸球体疾患、腎血管障害、尿細管機能異常、間質性腎疾患、全身性疾患による腎障害、腎癌など)、膀胱疾患(膀胱炎、膀胱癌など)が挙げられるがそれらに限定されない。

【0073】

別の実施形態において、本発明が対象とし得る疾患および障害は、生殖器系のものであり得る。そのような疾患または障害としては、例えば、男性生殖器疾患(男性不妊、前立

腺肥大症、前立腺癌、精巣癌など)、女性生殖器疾患(女性不妊、卵巣機能障害、子宮筋腫、子宮腺筋症、子宮癌、子宮内膜症、卵巣癌、絨毛性疾患など)が挙げられるがそれらに限定されない。

【0074】

本発明が対象とする動物は、脂肪細胞を有する動物であれば、どのような動物(たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など)であってもよい。好ましくは、そのような動物は、哺乳動物(例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など)であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、霊長類(たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト)が用いられる。最も好ましくはヒトが用いられる。本発明は、特に、ヒトにおいて厚生当局の基準をクリアするのが比較的容易である、ヒト由来の細胞を用いることができる容易になったという効果が留意されるべきである。

【0075】

本発明が医薬として使用される場合、そのような組成物は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

【0076】

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、本発明の細胞を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

【0077】

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシipientに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、 α -トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン)；親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)；アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン)；モノサッカライド、ジサッカライドおよび他の炭水化物(グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む)；キレート剤(例えば、EDTA)；糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)；塩形成対イオン(例えば、ナトリウム)；ならびに/あるいは非イオン性表面活性剤(例えば、Tween、プルロニック(pluronic)またはポリエチレングリコール(PEG))などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0078】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤(例えば、スクロース)を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

【0079】

以下に本発明の医薬組成物の一般的な調製法を示す。なお、動物薬組成物、医薬部外品、水産薬組成物、食品組成物および化粧品組成物等についても公知の調製法により製造することができる。

【0080】

本発明の細胞などは、薬学的に受容可能なキャリアと配合し、注射剤、懸濁剤、溶液剤、スプレー剤等の液状製剤として経口または非経口的に投与することができるが、目的とする処置を考慮すると、非経口的に投与されることが好ましい。薬学的に受容可能なキャリアとしては、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が挙げられる。また、必要に応じ、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることができる。また、本発明の組成物には本発明の細胞など以外の物質を配合することも可能である。非経口の投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膣内投与、患部への局所投与、皮膚投与など等が挙げられるがそれらに限定されない。全身投与されるとき、本発明において使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、pH、等張性、安定性などを考慮することにより、当業者は、容易に行うことができる。

【0081】

液状製剤における溶剤の好適な例としては、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油およびトウモロコシ油等が挙げられる。

【0082】

液状製剤における溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0083】

液状製剤における懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0084】

液状製剤における等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0085】

液状製剤における緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩およびクエン酸塩等の緩衝液等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0086】

液状製剤における無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウムおよび塩酸プロカイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0087】

液状製剤における防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0088】

液状製剤における抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロールおよびシステイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0089】

注射剤として調製する際には、液剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましい。通常、これらは、バクテリア保留フィルター等を用いるる過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化する。さらにこれらの処理後、凍結乾燥等の方法により固形物とし、使用直前に無菌水または無菌の注射用希釈剤（塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノールまたはこれらの混合溶液等）を添加してもよい。

【0090】

必要に応じて本発明の医薬は、着色料、保存剤、香料、矯味矯臭剤、甘味料等、ならびに他の薬剤を含んでもよい。

【0091】

本発明の処置方法において使用される組成物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。投与する量は、処置されるべき部位が必要とする量を見積もることによって確定することができる。

【0092】

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人（患者本人であり得る）に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ（ウェブサイト）、電子メール）のような形態でも提供され得る。

【0093】

本発明の方法による治療の終了の判断は、商業的に利用できるアッセイもしくは機器使用による標準的な臨床検査の結果または分化細胞の欠損に関連する疾患（例えば、眼科疾患、骨疾患、心臓疾患、神経疾患）に特徴的な臨床症状の消滅によって支持され得る。治療は、分化細胞の欠損などに関連する疾患（例えば、眼科疾患、骨疾患、心臓疾患、神経疾患）の再発により再開することができる。

【0094】

本発明はまた、本発明の医薬の1つ以上の成分を満たした1つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に任意に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。

【0095】

（好ましい実施形態の説明）

以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

【0096】

（フィーダー細胞）

1つの局面において、本発明は、フィーダー細胞として用いるための、脂肪組織に由来する細胞を提供する。脂肪組織からは種々の細胞が分離され得るが、本発明では、特に、組織幹細胞または線維芽細胞を含んでいることが好ましい。幹細胞は、CD105（+）、CD73（+）、CD29（+）、CD44（+）、CD14（-）、CD34（-）およびCD45（-）からなる群より選択される少なくとも1つの指標を確認することによって同定することができる。

【0097】

理論に束縛されないが、本発明のフィーダー細胞は、VEGFなどのサイトカインが効

率よく分泌されることが観察されている。従って、好ましい実施形態では、本発明のフィーダー細胞は、VEGFを分泌する性質を有し、より好ましくは、本発明のフィーダー細胞としては、VEGFを平滑筋細胞の少なくとも2倍分泌する細胞を含む細胞集団が使用される。

【0098】

別の好ましい実施形態では、本発明のフィーダー細胞は、少なくとも800nmol/ml（より好ましくは、約1500nmol/ml）のVEGFを分泌する細胞を含む細胞集団が使用される。このようにVEGFを顕著に多く分泌する細胞を含む細胞集団は、これまでに報告があったということは本発明者らの知るところではなく、しかも、このようにVEGFを顕著に多く分泌する細胞を含む細胞集団がフィーダー細胞として使用することができるという知見も本発明者らの知るところではないことから、本発明の一つの顕著な効果の一つであるといえることができる。

【0099】

本発明のフィーダー細胞は、どのような細胞であっても支持することができ、従って、指示を必要とする細胞であればどのような細胞であっても支持することができる。好ましい実施形態では、そのような支持されるべき細胞としては、胚性幹細胞、組織幹細胞または分化細胞が挙げられるがそれらに限定されない。

【0100】

1つの好ましい実施形態において、本発明のフィーダー細胞は、角膜を維持するために用いられる。このように、角膜を、例えば、エキソビオで培養再生することができるという知見はこれまでにではなく、特に脂肪組織から採取可能な細胞をフィーダー細胞とすることができるという点は、格別な効果といえる。

【0101】

1つの好ましい実施形態において、本発明において使用されるフィーダー細胞は、初代培養細胞を含むことが好ましい。理論に束縛されることを望まないが、細胞株では、免疫拒絶の可能性が否定しきれないこと、初代培養であれば、自己の細胞を適用可能であることなどが本発明の利点として挙げられるがそれらに限定されない。このような細胞は、厳密な意味での初代培養細胞であることが好ましいが、継代培養した細胞であっても、継代数が少ないものであれば、初代培養細胞とほぼ類似する性質を有し得ることから、本発明において有利に使用することができる。そのような継代数としては、例えば、約5継代以下、4継代以下、3継代以下、2継代以下、1継代などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0102】

ヒトの場合、ES細胞から分化誘導した線維芽細胞をフィーダー細胞に用いた報告があり、フィーダー効果も認められている。他方、成体の細胞を用いた先行技術ではいずれも効果は全くないか、あってもごく弱いという報告あるのみである（Rheinwald J G, Green H., Cell 1975; 6:331-344）。したがって、1つの実施形態において、本発明では、成体細胞を用いて高い効果を示せたことが従来技術にはない効果のひとつであるといえる。本発明はまた、成体の脂肪由来の線維芽細胞は、成体の脂肪組織以外の組織由来の線維芽細胞よりも効果があるようであるという点も留意されるべきである。

【0103】

1つの好ましい実施形態において、本発明において使用されるフィーダー細胞は、ヒト細胞を含み、特にヒト細胞からなることが好ましい。従来の技術では、マウスの樹立細胞株（例えば、STO細胞）、または初代培養線維芽細胞などがフィーダーとして用いられ、ヒトにおいても状況は同じであったことから、本発明がもたらす効果は、ヒトの再生治療において、汚染および感染の危険が格段に減少する（特に、自己細胞を用いる場合）という効果をもたらすことに留意すべきことが理解されるべきである。

【0104】

好ましい実施形態において、本発明のフィーダー細胞は、マイトマイシンCなどの抗生

物質または放射線照射などによる処理が行われたものであることが有利である。フィーダー細胞の増殖を止める目的で処理または照射することによって、フィーダー効果が期待される細胞に対する悪影響を防止することができるからである。

【0105】

(再生治療方法)

別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法を提供する。この方法は、A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；およびB) 該一部または該幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程を包含する。ここで、所望の臓器、組織または細胞の一部は、細胞であってもよく、組織片または組織そのもの、あるいは臓器そのものであってもよい。再生を意図することから、このような「一部」は、正常な臓器、組織または細胞から一部が欠損したものが対象とされることが好ましい。ここで、幹細胞は、所望の臓器、組織または細胞に分化することができる限り、どのような幹細胞を用いてもよい。従って、胚性幹細胞は、全能性を有することから、本発明において好ましい実施形態のひとつであり得る。幹細胞が用いられる場合、培養は、所望の臓器、組織または細胞への分化を促進するような因子および/または栄養を含む培養液を用いることが好ましい。そのような分化促進因子は、所望の組織、臓器などによって変動する。そのような因子としては、細胞生理活性物質（例えば、増殖因子、サイトカイン、細胞外マトリクスなど）が挙げられるがそれらに限定されない。

【0106】

そのような因子の具体例としては、例えば、A) 角膜のための上皮増殖因子 (EGF)；B) 皮膚 (ケラチノサイト) のための TGF- β 、FGF-7 (KGF のための keratinocyte growth factor)、EGF；C) 血管内皮のための VEGF、FGF、アンギオポエチン (angiopoietin)；D) 腎臓のための LIF、BMP、FGF、GDNF；E) 心臓のための HGF、LIF、VEGF；F) 肝臓のための HGF、TGF- β 、IL-6、EGF、VEGF；G) 臍帯内皮のための VEGF；H) 腸管上皮のための EGF、IGF-I、HGF、KGF、TGF- β 、IL-11；I) 神経のための神経成長因子 (NGF)、BDNF (脳由来神経栄養因子)、GDNF (グリア細胞由来神経栄養因子)、ニューロトロフィン (neurotrophin)、IL-6、TGF- β 、TNF；J) グリア細胞のための TGF- β 、TNF- α 、EGF、LIF、IL-6；K) 末梢神経細胞のための bFGF、LIF、TGF- β 、IL-6、VEGF；L) 肺 (肺胞上皮) のための TGF- β 、IL-13、IL-1 β 、KGF、HGF；M) 胎盤のための成長ホルモン (GH)、IGF、プロラクチン、LIF、IL-1、アクチビン A、EGF；N) 脾臓上皮のための成長ホルモン、プロラクチン；O) 脾臓ランゲルハンス氏島細胞のための TGF- β 、IGF、PDGF、EGF、TGF- β 、TRH (thyrotropin)；P) 関節滑膜上皮のための FGF、TGF- β ；Q) 骨芽細胞のための BMP、FGF；R) 軟骨芽細胞のための FGF、TGF- β 、BMP、TNF- α ；S) 網膜細胞のための FGF、CNTF (絨毛神経栄養因子 = ciliary neurotrophic factor)；T) 脂肪細胞のためのインスリン、IGF、LIF；U) 筋肉細胞のための LIF、TNF- α 、FGF が挙げられるがそれらに限定されない。

【0107】

本発明の方法において、所望の臓器、組織または細胞は、表皮系の臓器、組織または細胞が代表例として挙げられるがそれらに限定されない。そのような所望の臓器、組織または細胞の具体例としては、例えば、角膜、骨、軟骨、心臓、心膜、血管、皮膚、腎臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、関節、筋肉、四肢末梢、脂肪および網膜ならびにその一部などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0108】

本発明の再生治療法で使用されるフィーダー細胞は、上述の「フィーダー細胞」に説明されるようなフィーダー細胞を用いることができ、例えば、組織幹細胞、線維芽細胞を含

み得る。あるいは、本発明において用いられるフィーダー細胞は、初代培養細胞であり得る。このような初代培養細胞は、どのような由来のものであってもよいが、好ましくは、同じ種の細胞であることが好ましく、より好ましくは、同系のものが有利であり、さらに好ましくは自家細胞であることがもっとも好ましい。免疫拒絶反応が同系または自己細胞の使用によってなくなるからである。

【0109】

また、本発明の再生治療法では、ヒト細胞が用いられることが好ましい。ヒト細胞がフィーダー細胞として用いられるという報告は、細胞株においてのみ知られるだけであり、初代培養細胞では知られていなかったからである。本発明の再生治療法は、被検体をヒトとして、異種細胞を用いることなく治療することができるという点で従来達成できなかった利点を有する。なぜなら、異種細胞を用いた場合は、移植組織の臨床観察期間はFDAの指針として20年と決められているからであり、そのような治療は、多大な労力がかかる割には、免疫拒絶という不安がいつまでも付きまとうという欠点が存在するからである。本発明の方法は、ヒトが被検体であった場合に上記のような欠点を克服することから、従来技術では達成できなかった効果がある。

【0110】

本発明は、脂肪組織からの供給源を提供することができるという点がある利点のひとつであるといえる。脂肪組織からの摘出は、ノーストレスで採取可能であるという利点のほか、外来レベルで摘出が可能であり、繰り返して行うことができ、大量に得ることができるなどの利点があることが留意されるべきである。

【0111】

本発明の再生治療法は、エキソビボで行われる。エキソビボでの治療は、自己細胞を戻すことを前提としていることから、生体適合性という観点からは最良の結果をもたらすことになる。

【0112】

本発明の再生治療法において、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞と、フィーダー細胞とは、フィーダー細胞が支持する機能を発揮する限り、異種、同種異系または同系のいずれの関係にあってもよいが、好ましくは、同系であり、より好ましくは、自家であり得る。理論に束縛されないが、同系であれば、免疫拒絶反応が抑制できるからである。しかし、拒絶反応が予測される場合は、拒絶反応を回避する工程をさらに包含してもよい。拒絶反応を回避する手順は当該分野において公知であり、例えば、新外科学体系、第12巻、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて（改訂第3版）、中山書店などに記載されている。そのような方法としては、例えば、免疫抑制剤、ステロイド剤の使用などの方法が挙げられる。拒絶反応を予防する免疫抑制剤は、現在、「シクロスポリン」（サンディミュン／ネオオラル）、「タクロリムス」（プログラフ）、「アザチオプリン」（イムラン）、「ステロイドホルモン」（プレドニン、メチルプレドニン）、「T細胞抗体」（OKT3、ATGなど）があり、予防的免疫抑制療法として世界の多くの施設で行われている方法は、「シクロスポリン、アザチオプリン、ステロイドホルモン」の3剤併用である。免疫抑制剤は、本発明の併用療法と同時期に投与されることが望ましいが、必ずしも必要ではない。従って、免疫抑制効果が達成される限り免疫抑制剤は本発明の併用療法の前または後にも投与され得る。

【0113】

1つの好ましい実施形態において、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞は、被検体から摘出されてすぐのものであるか、または凍結保存されたものである。摘出されてすぐのものを用いることが好ましい。本発明においてすぐとは、摘出されて通常細胞を調製するのにかかる時間をいう。従って、そのような時間とは、例えば、1時間、2時間、3時間などが挙げられるが、それより短くても長くてもよいことが理解される。所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞は凍結保存されてもよい。そのような凍結保存は、当該分野において公知の方法を用いることができる。そのような保存方法としては、例えば、DMSOを含む溶液中などへの保存が挙げら

れるがそれらに限定されない。

【0114】

1つの実施形態において、本発明の再生治療法における培養の条件、および本発明において使用される所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞の培養の提供の条件は、その細胞、組織または臓器を培養するために通常用いられるものであれば、用いることができる。そのような培養条件の例としては、例えば、培養条件は通常、37℃、5%CO₂を利用することができる。使用する培地もまた、任意のものを利用することができ、例えば、DMEM/Ham12(1:1)、10%FCS、インスリン・コレラトキシンなどを含む培地を利用することができる。また、必要に応じて、分化因子(例えば、EGF(10ng/ml))を予め含めた培養液を使用してもよいがそれらに限定されない。

【0115】

1つの実施形態において、本発明の再生治療法における培養では、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞と、フィーダー細胞との比率が、10:1~1:10、好ましくは7:1~1:7、最も好ましくは5:1~1:5であることが有利である。理論に束縛されないが、フィーダー細胞が幹細胞よりも少し少ない方が有利であるようである。

【0116】

一つの好ましい実施形態において、本発明の方法における培養のために、分化因子を加えることができる。そのような分化因子としては、例えば、DNA脱メチル化剤(5-アザシチジンなど)、ヒストン脱アセチル化剤(トリコスタチンなど)、核内レセプターリガンド(例えば、レチノイン酸(ATRA)、ビタミンD₃、T₃など)、細胞増殖因子(アクチビン、IGF-1、FGF、PDGF、TGF-β、BMP2/4など)、サイトカイン(LIF、IL-2、IL-6など)、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ジメチルアセトアミド、ジブチルcAMP、ジメチオルスルホキシド、ヨードデオキシウリジン、ヒドロキシル尿素、シトシンアラビノシド、マイトマイシンC、酪酸ナトリウム、アフイディコリン、フルオロデオキシウリジン、ポリブレン、セレンなどが挙げられるがそれらに限定されない。角膜への分化には、EGFという分化因子を加えることができる。他の分化細胞についてもまた、本明細書において記載される任意の分化因子を使用することができる。

【0117】

他の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法を提供する。この方法は、A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；B) 該一部または該幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程；およびC) 該培養された該一部または該幹細胞を該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、を包含する。ここで、工程A) および工程B) は、本節において上述した任意の形態が用いられ得る。

【0118】

投与の方法もまた、当該分野において公知の任意の方法を用いることができる。そのような方法として、シリンジ、カテーテル、チューブなどを用いての注入が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、局所注入(皮下注入、筋肉や脂肪など臓器内注入)、静脈内注入、動脈内注入、組織上投与などを用いる。

【0119】

処置されるべき部位への移植は、直接であっても間接であってもよい。従って、B)までの工程で調製した移植片を処置される部位に直接移植してもよいし、あるいは、被検体中の任意の場所に移植して、体内の送達システムを利用して処置されるべき部位に移植されるようにしてもよい。そのような形態は、当業者であれば、適宜選択することができる。好ましくは、直接移植することが好ましい。特に、角膜など、正確な場所に投与されるべき場合は、直接移植することが所望される。

【0120】

好ましい実施形態において、本発明の方法は上記に加え、さらに、マイトマイシンCまたは放射線照射などの処理をすることが有利である。フィーダー細胞の増殖を止める目的で添加または照射することにより、癌化を抑制したり、所望されない細胞の異常増殖を防止することができるからである。

【0121】

(再生治療システム)

別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するためのシステムを提供する。このシステムは、A) 容器；B) 脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞、を備える。ここで、容器としては、フィーダー細胞を付着させ、その上に再生させるべき細胞が収容されることができ、どのような容器であってもよい。従って、任意の容器が使用され得る。好ましくは、そのような容器の材質は、生体適合性のものが使用されることが望ましいが、生体に毒性を与えるものが使用されていない限り、どのようなものであっても使用することができ、ことが理解される。そのような容器の材質としては、例えば、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料、あるいは、シラン、ポリシリジンコートなどでコーティングされたものが使用され得る。

【0122】

本発明の再生治療システムにおいて使用されるフィーダー細胞は、上述の本発明のフィーダー細胞であれば任意のフィーダー細胞を使用することができる。

【0123】

このようなシステムは、好ましくは、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供するための提供手段（すなわち、幹細胞採取デバイ）をさらに備えることが有利である。そのような提供手段は、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供することができ、どのようなものであってもよいが、例えば、被検体から細胞を取り出す手段（例えば、カテーテル、かきとり棒、ピンセット、注射器、医療用はさみ、内視鏡などを挙げる）ができるが、それらに限定されないことが理解されるべきである。

【0124】

好ましい実施形態において、本発明のシステムは上記に加え、さらに、分化因子を備えていてもよい。そのような分化因子としては、例えば、DNA脱メチル化剤（5-アザシジンなど）、ヒストン脱アセチル化剤（トリコスタチンなど）、核内レセプターリガンド（例えば、レチノイン酸（ATRA）、ビタミンD₃、T₃など）、細胞増殖因子（アクチビン、IGF-1、FGF、PDGF、TGF- β 、BMP2/4など）、サイトカイン（LIF、IL-2、IL-6など）、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ジメチルアセトアミド、ジブチルcAMP、ジメチオルスルホキシド、ヨードデオキシウリジン、ヒドロキシル尿素、シトシンアラビノシド、マイトマイシンC、酪酸ナトリウム、アフィディコリン、フルオロデオキシウリジン、ポリブレン、セレンなどが挙げられるがそれらに限定されない。この分化因子は、粉末で提供されていてもよく、液剤として提供されていてもよい、あるいは、他の培地成分と混合されていてもよく、単独で提供されてもよい。

【0125】

好ましい実施形態において、本発明のシステムは上記に加え、さらに、マイトマイシンCまたは放射線源を備えることが有利である。フィーダー細胞の増殖を止める目的で添加または照射することができ、からである。

【0126】

(共移植)

別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための別の方法を提供する。この別の方法は、A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、および脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞を、該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、を包含する。このような共移植の方法もまた、本発明のフィーダー細胞がもたらす効果によって達成されるものである。ここで、フィーダー細胞および幹細胞は、上記再生方法において用いられる任意のものを使用することができる。ここで、幹細胞とフィーダー細胞とは、任意の比率で混合できるが、好ましくは、フィーダー細胞より幹細胞が多いことが有利であり得る。幹細胞とフィーダー細胞とは、同時に移植されてもよく、どちらかが先に移植されてもよい。

【0127】

好ましい実施形態において、本発明の方法は上記に加え、さらに、マイトマイシンCなどの抗生物質または放射線照射で処理がされたものを用いることが有利である。所望されない細胞の異常増殖を防止し、または癌化を防止することができるからである。

【0128】

他の局面において、本発明は、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、および脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞、を含む、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を提供する。ここで、フィーダー細胞および幹細胞は、上記別の再生方法において用いられる任意のものを使用することができる。

【0129】**(脂肪組織由来細胞の使用)**

別の局面において、本発明は、フィーダー細胞としての、脂肪組織に由来する細胞の使用を提供する。さらに別の局面において、本発明は、フィーダー細胞を含む医薬を製造するための、脂肪組織に由来する細胞の使用を提供する。なおさらに別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を製造するための、脂肪組織に由来する細胞の使用を提供する。ここで使用されるフィーダー細胞は、本発明のフィーダー細胞であればどのようなものであってもよく、その説明は、上記「フィーダー細胞」にあり、その記載が参酌される。

【0130】**(ヒト線維芽細胞の使用)**

1つの局面において、本発明は、フィーダー細胞として用いるための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を提供する。ヒトの線維芽細胞初代培養細胞がフィーダー細胞として用いられるという例がこれまで存在せず、したがって、本発明は、人体において自己治療も可能な初代培養細胞がフィーダー細胞として使用することができるという顕著な効果を奏することになる。ここで、初代培養細胞としては、通常、5代までの継代のものを利用することができるがそれに限定されない。

【0131】

別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法を提供する。この方法は、A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；およびB) 該一部または該幹細胞を、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程、を包含する。フィーダー細胞は、ヒト線維芽細胞初代培養細胞であれば、どのような細胞であってもよい。

【0132】

他の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するためのシステムを提供する。このシステムは、A) 容器；B) ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞、を備え、必要に応じて、幹細胞採取手段、分化因子などを含むことができる。そのような容器、幹細胞採取手段、分化因子などは、本明細書において上述したものなどを使用することができる。

【0133】

別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための方法を

提供する。このような方法は、A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；B) 該一部または該幹細胞を、ヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程；およびC) 該培養された該一部または該幹細胞を該被検体の処置されるべき部位に移植する工程を包含する。ここで、幹細胞の提供は、本明細書において別の場所に説明されている。線維芽細胞初代培養細胞としては、上述のように任意のものを使用することができるが、好ましくは、継代を経ていないものを利用することができる。

【0134】

他の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための別の方法を提供する。この別の方法は、A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、およびヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞を、該被検体の処置されるべき部位に移植する工程、を包含する。ここで、幹細胞の詳細な形態としては、本明細書において別の場所に説明されている任意のものを利用することができる。線維芽細胞初代培養細胞としては、上述のように任意のものを使用することができるが、好ましくは、継代を経ていないものを利用することができる。

【0135】

他の局面において、本発明は、所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞、およびヒト線維芽細胞初代培養細胞を含むフィーダー細胞、を含む被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を提供する。ここで、幹細胞の詳細な形態としては、本明細書において別の場所に説明されている任意のものを利用することができる。線維芽細胞初代培養細胞としては、上述のように任意のものを使用することができるが、好ましくは、継代を経ていないものを利用することができる。

【0136】

別の局面において、本発明は、フィーダー細胞としての、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用を提供する。他の局面において、本発明は、フィーダー細胞を含む医薬を製造するための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用を提供する。なおさらに別の局面において、本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための医薬を製造するための、ヒト線維芽細胞初代培養細胞の使用を提供する。このような使用方法は、本明細書において上述し、以下の実施例において例示されるとおりである。

【0137】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0138】

以下に示した実施例において使用した試薬は、特に言及しない限り和光純薬、Sigmaから得た。動物の飼育は、National Society for Medical Researchg作成した「Principles of Laboratory Animal Care」およびInstitute of Laboratory Animal Resourceが作成、National Institute of Healthが公表した「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication, No. 86-23, 1985, 改訂)に遵って、大阪大学医学部において規定される基準に違い、動物愛護精神に則って行った。ヒトを対象とする場合は、厚生労働省の基準に従い、事前に同意を得た上で実験を行う。

【0139】

(実施例1：脂肪組織由来細胞の調製)

本実施例では、まず、本実験に対して同意を示したヒトから細胞を脂肪組織から調製した。脂肪吸引物を生理食塩水で十分に洗浄した。上層に脂肪吸引物、下層に生理食塩水が十分に分離したのを確認し、下層を捨て、肉眼で見て生理食塩水がほぼ透明になるまでこ

れを繰り返した。この実施例では、7回行った。脂肪組織を40mlと同量40mlの0.075%コラゲナーゼ/PBS (Gibco) を加え、37℃でよく攪拌しながら1時間インキュベートした。この試料に、同量の10%血清加DMEMを加え、1200×gで10分間遠心分離した。

【0140】

遠心分離により得られたペレットに0.16M NH₄Cl/PBS (Gibco) を加えて懸濁し、25℃で20分間インキュベートした。この試料を口径100μmのメッシュ (Whatman) を用いて吸引ろ過した。このろ過物を1200×gで5分間遠心分離した。この細胞は線維芽細胞様の細胞であった。

【0141】

(実施例2: 脂肪組織由来細胞中の幹細胞の確認)

実施例1において調製した細胞中に幹細胞が含まれていることは、細胞マーカー (CD105、CD73、CD29、CD44およびScα-1) により確認する。細胞マーカーの存在は、ELISAまたはウェスタンブロットなどの免疫化学的手法を用いることによって同定することができる。

【0142】

(実施例3: 脂肪組織由来細胞の特徴づけ)

次に、実施例1において調製した細胞中の細胞が、サイトカイン分泌能を亢進していることを確認した。まず、VEGFについて、抗VEGF抗体を用いて細胞分泌物をサンプルとして、ELISAを行った。ELISAは、R&D社から入手可能なELISAキットを用いて行った。コントロールとして、ヒト血管内皮細胞およびヒト由来平滑筋細胞を測定した。

【0143】

その結果、ヒト血管内皮細胞は、100nmol/ml、ヒト由来平滑筋細胞は約800nmol/ml、および実施例1において調製した細胞は、約1500nmol/ml VEGFを分泌していることが分かった。従って、本発明の細胞は、VEGFが、通常の細胞に比べて、約2~15倍に亢進していたことが確認された。理論に束縛されることを望まないが、本発明の細胞は、細胞生理活性物質 (例えば、増殖因子、サイトカインなど) の分泌が亢進されている細胞を含むことによって、フィーダー効果を増進させているようであることが明らかになった。

【0144】

(実施例4: 角膜上皮幹細胞の摘出)

次に、ウサギ (ニュージーランドホワイト種; 日本チャールズリバー) をモデルとして、角膜細胞の再生を試みる。まず、角膜上皮幹細胞をウサギから調製した。そのプロトコルを以下に示す。

【0145】

ドナー角膜あるいはホスト健常眼 (片眼性疾患の場合) の角膜上皮の幹細胞を角膜輪部より採取した。この場合、角膜中心部から離れた角膜輪部の1mm径の1断片のみを採取するので、たとえliving-related ドナー眼またはホスト健常眼から採取しても、その傷害は瘢痕をのこすことなく治癒し、視力には影響を与えない。術後には治療用コンタクトレンズを装用させるので、創傷治癒も早く、痛みも軽度である。術後の痛みに対して、鎮痛剤と抗生物質、消炎剤で対処する。このウサギは、早期に創傷治癒したことが確認された。

【0146】

この細胞を所望の幹細胞として用いた。

【0147】

(実施例5: 口腔粘膜幹細胞の調製)

次に、ウサギ (ニュージーランドホワイト種; 日本チャールズリバー) をモデルとして、角膜細胞の再生を試みる。角膜が喪失されている場合への応用を試みるため、口腔粘膜上皮幹細胞をウサギから調製する。そのプロトコルを以下に示す。

【0148】

ドナー口腔粘膜あるいはホスト健常口腔粘膜の口腔粘膜上皮の幹細胞を口腔粘膜より採取する。頬粘膜から、3～5mm径の1断片のみを採取する。口腔粘膜は再生能力が高いのでその傷害は瘢痕をのこすことなく治癒し、口腔の機能には影響を与えない。口腔は治癒が速い組織であることから、創傷治癒も早く、痛みも軽度である。ホストからの口腔粘膜の採取であるが、術後の痛みに対して、鎮痛剤と抗生物質、消炎剤で対処する。通常早期に創傷治癒する。

【0149】

この細胞を所望の幹細胞の例として用いる。

【0150】

(実施例6:コロニー形成アッセイによる確認)

実施例4において調製した幹細胞を、実施例1において調製したフィーダー細胞上で培養して、コロニー形成アッセイによりフィーダー効果があるかどうかを確認した。本実験ではコロニーが形成されるとフィーダー効果があるということを実証することになる。

【0151】

幹細胞を、フィーダー細胞上で、DMEM/Ham's 12 (1:1;ともにGibcoから入手)に10%ウシ胎仔血清(FCS=ハナネスコバイオ、東京から入手)ならびにインスリン($5\mu\text{g}/\text{ml}$ =Sigmaから入手)、コレラトキシン(1nM =和光純薬、大阪から入手)およびEGF($10\text{ng}/\text{ml}$ =Genzyme、Cambridge, MAから入手)を添加した培地中で培養した。培養後、コロニーはローダミンで染色した。ウサギ角膜上皮細胞(初代/8週齢)を1000個播種した。コントロールとして、3T3をフィーダーとして用いたものを使用した。フィーダー細胞は、それぞれ、3T3は、 2×10^4 細胞使用し、深部組織由来細胞は、 1×10^4 細胞使用し、皮下組織由来細胞は、 1×10^4 細胞使用した。(図中の $\mu\text{g}/\text{ml}$ は、マイトマイシンCの濃度を示す)。

【0152】

結果を図2～4に示す。図2は、3T3細胞を用いた場合、図3は、深部の組織由来細胞を用いた場合、図4は、皮下の脂肪組織由来細胞を用いた場合を示す。本発明の脂肪由来の細胞で、従来使用されている3T3と同様のコロニーが形成されたことがわかった。このように、本発明の脂肪組織由来の細胞がフィーダー細胞として使用できることがわかった。

【0153】

実施例5において調製する幹細胞もまた、上記同様にフィーダー効果を確認することができる。

【0154】

(実施例7:フィーダー細胞システムの調製)

次に、実施例1で調製された細胞をフィーダー細胞とするシステムを構築する。この細胞を、温度応答性皿を用いて、その上にフィーダー細胞を播種した。このフィーダーシステムを用いて再生を行った。温度応答性培養皿の準備は以下のようにして行う。温度応答性インテリジェントポリマー(N-イソピルアルクリアミド)を電子線照射を用いて培養皿に共有結合で固定化する。本実施例では、株式会社セルシード(<http://www.cellseed.com/>;東京、日本)から入手した。

【0155】

(実施例8:角膜上皮幹細胞の分化)

実施例7で調製したシステムを用いて、角膜上皮幹細胞を37℃で2週間培養した。培養液は、実施例6に使用したものと同一組成のものを使用した。その模式図を図1に示す。

【0156】

まず3T3細胞および実施例1で調製した細胞にマイトマイシン処理して増殖活性を消失させて、温度応答性インテリジェントポリマーをコートした培養皿に播種し培養した。

【0157】

つぎに採取した角膜輪部片、口腔粘膜片にディスパーゼを作用させて、上皮層を基底膜

から剥離する。ついで、トリプシン・EDTA液 (C l o n t e c h) で細胞層をバラバラにして1つの細胞にした。

【0158】

これを、マイトマイシン処理3T3細胞 (2×10^4 細胞/ml) またはマイトマイシン処理した実施例1で調製した細胞 (2×10^4 細胞/ml) を播種した温度応答性インテリジェントポリマーをコートした培養皿に播種する (1×10^5 細胞/ml)。採取後から培養過程はすべてクリーンベンチ内で清潔操作にて行う。培養は一貫した清潔環境で行う。

【0159】

培養開始後7日および10日後のシート形成を確認する。その結果、本実施例1で調製した細胞は、3T3細胞と同様に、ウサギ幹細胞をシート状に再生させるフィーダー効果を有することが明らかになる。

【0160】

(実施例9: ヒト角膜上皮幹細胞の分化)

次に、実施例8と同様の実験系を用いて、ヒト幹細胞が実際に再生されるかどうかを確認した。まず、ヒトからの細胞採取の方法を以下に示す。

【0161】

ドナー角膜あるいはホスト健常眼 (片眼性疾患の場合) の角膜上皮の幹細胞を角膜輪部より採取した。この場合、角膜中心部から離れた角膜輪部の1mm径の1断片のみを採取するので、たとえliving-related ドナー眼またはホスト健常眼から採取しても、その傷害は瘢痕をのこすことなく治癒し、視力には影響を与えない。術後には治療用コンタクトレンズを装用させるので、創傷治癒も早く、痛みも軽度である。術後の痛みに対して、鎮痛剤と抗生物質、消炎剤で対処する。この患者は、早期に創傷治癒したことが確認された。なお、患者に対しては、予め、組織採取の部位や大きさ、術後の痛みについて十分に説明し、同意を得ておいた。

【0162】

実施例8と同様に、3T3細胞および実施例1で調製した細胞にマイトマイシン処理して増殖活性を消失させて、温度応答性インテリジェントポリマーをコートした培養皿に播種し培養した。

【0163】

つぎに採取した角膜輪部片、口腔粘膜片にデイスパーゼを作用させて、上皮層を基底膜から剥離する。ついで、トリプシン・EDTA液 (C l o n t e c h) で細胞層をバラバラにして1つの細胞にした。

【0164】

これを、マイトマイシン処理3T3細胞 (2×10^4 細胞/ml) またはマイトマイシン処理した実施例1で調製した細胞 (2×10^4 細胞/ml) を播種した温度応答性インテリジェントポリマーをコートした培養皿に播種した (1×10^5 細胞/ml)。採取後から培養過程はすべてクリーンベンチ内で清潔操作にて行った。培養は一貫した清潔環境で行った。本実施例において培養液は、実施例6に使用したものと同一組成のものを使用し、培養液ならびに培養液に添加するウシ血清はプリオンフリーのオーストラリア産のトレイサビリティのあるもの (ハナネスコバイオ、東京から入手) を使用した。

【0165】

培養開始後7日および10日後のシート形成を確認した。その結果を、図5に示す。図5から明らかなように、ヒト角膜上皮細胞が角膜細胞様に分化していることが明らかになった。その分化の様子は、3T3もヒト線維芽細胞もそれほど差異がなく、ヒト線維芽細胞初代培養細胞のフィーダー効果は、十分にあることが明らかになった。従って、本発明の細胞は、3T3細胞と同様に、ヒト角膜の幹細胞をシート状に再生させる場合もフィーダー効果を有することが明らかになった。

【0166】

(実施例10: ヒト口腔上皮幹細胞の分化)

次に、口腔粘膜細胞を用いた場合も同様にシート状に再生されることを確認する。

【0167】

ドナー口腔粘膜あるいはホスト健常口腔粘膜の口腔粘膜上皮の幹細胞を口腔粘膜より採取する。頬粘膜から、3～5mm径の1断片のみを採取する。口腔粘膜は再生能力が高いのでその傷害は癒痕をのこすことなく治癒し、口腔の機能には影響を与えない。口腔は治癒が速い組織であることから、創傷治癒も早く、痛みも軽度である。ホストからの口腔粘膜の採取であるが、術後の痛みに対して、鎮痛剤と抗生物質、消炎剤で対処する。通常早期に創傷治癒する。なお、患者に対しては、予め、組織採取の部位や大きさ、術後の痛みについて十分に説明し、同意を得ておく。

【0168】

これ以外の手順は実施例10に従って、行う。その結果、従って、本発明の細胞は、3T3細胞と同様に、ヒト口腔粘膜細胞の幹細胞をシート状に再生させる場合もフィーダー効果を有することが明らかになる。

【0169】

(実施例11:ウサギ角膜上皮幹細胞の分化組織の移植)

次に、実施例8で調製したシートをウサギに移植する。ここでは、分化細胞の集合物を実際の角膜に移植して生着するかどうかを確認する。

【0170】

実施例8のとおり組織シートを2週間かけて調製した後に、培養角膜上皮を使用する前に、血清を含まない液で洗浄した後に移植を行う。移植直前に細菌、真菌培養検査を行って、細菌、真菌の汚染がないことを確認した後で使用する。また、ドナー角膜1つで複数の患者に使用してもよい。

【0171】

2週間後、シート状になった細胞集合物を分離した分離は、温度を下げることによって行う。生着は1週間ごとに観察する。炎症、石灰化、免疫反応などがいないかを確認する。その結果、細胞集合物は、一定期間経た後も顕著な有害作用なしに生着しているが確認される。

【0172】

(実施例12:ヒトでの再生治療—ヒト角膜上皮幹細胞の分化組織の移植)

実施例9で調製したシートをヒト患者に移植する。ここでは、分化細胞の集合物を実際の角膜に移植して生着するかどうかを確認する。なお、患者に対しては、予め、処置の方法、術後の痛み、可能性のある副作用について十分に説明し、同意を得ておく。

【0173】

人体の実験の際は、少なくとも以下の点に留意する。

【0174】

(1) 局所麻酔あるいは全身麻酔下で行う。

【0175】

(2) 角膜・結膜の癒痕性組織を可能な限り除去した後、培養上皮シートを移植する。

【0176】

(3) 術前・術後管理は角膜移植に準じる(角膜移植ガイドンス、坪田ら著、南江堂—適応から術後管理まで、2002を参照)。

【0177】

実施例9のとおり組織シートを2週間かけて調製した後に、培養角膜上皮を使用する前に、血清を含まない液で洗浄した後に移植を行う。移植直前に細菌、真菌培養検査を行って、細菌、真菌の汚染がないことを確認した後で使用する。また、ドナー角膜1つで複数の患者に使用してもよいが本実施例ではまず片眼で行う。

【0178】

2週間後、シート状になった細胞集合物を分離した分離は、温度を下げることによって行う。生着は1週間ごとに観察する。炎症、石灰化、免疫反応などがいないかを確認する。その結果、細胞集合物は、一定期間経た後も顕著な有害作用なしに生着しているが確認さ

れる。

【0179】

(実施例13：ヒトでの再生治療－ヒト口腔膜上皮幹細胞の分化組織の移植)

次に、同意を得た患者から、口腔粘膜上皮幹細胞を採取し、実施例10と同様の処置を行う。すると、シート状の移植物が調製される。そのシート状の移植物をヒト被検体移植すると、口腔粘膜幹細胞由来のシートであっても充分機能する移植物ができることがわかる。

【0180】

次に、実施例12と同様に、ヒト角膜へ移植する。その結果、口腔膜上皮幹細胞を分化させた細胞集合体もまた、一定期間経た後も顕著な有害作用なしに生着しているが確認される。

【0181】

(実施例14：角膜以外の処置法－表皮)

本発明のフィーダー細胞が角膜と同様に表皮の培養に用いることができることを確認する。通常のプロトコルで培養される他家移植片である既に市販されている表皮シートであっても、自家の脂肪組織由来の線維芽細胞と共培養あるいは付着することができると確認する。

【0182】

表皮を、当該分野において公知の方法を利用して採取する。具体的には予め同意を得ていたヒト患者から皮膚を採取する。この皮膚から、実施例9または10に記載の手順に順じて幹細胞を調製する。この幹細胞を、実施例9または10と同様の手法を用いて、本発明の細胞のフィーダー効果を確認する。幹細胞を角膜と同様の手法を用いて温度応答膜を用いてシート化する。すると、シート化が角膜同様に行われることが確認される。

【0183】

(実施例15：胚性幹細胞での効果)

次に、本発明のフィーダー細胞が胚性幹細胞でもフィーダー効果を発揮することができることを確認する。胚性幹細胞は、非特許文献1に記載されるような手法を用いて調製する。この胚性幹細胞を、実施例9または10に記載の手順を用いて、本発明の細胞のフィーダー効果を確認する。分化因子を用いない場合は、増幅（未分化状態を保ったまま維持および増殖させる）効果を奏することが企図される。所望の分化因子とともに胚性幹細胞を用いる場合、種々の臓器への分化が促進されることも確認することができる。

【0184】

胚性幹細胞を用いる場合、あらかじめレシピエントの脂肪組織幹細胞から採取した本細胞とES細胞を共培養しておけば、ES細胞から作られた臓器或いは組織に対して、レシピエントは免疫拒絶反応を起こさない可能性が高まる。再生医療のみならず今後予想される、細胞あるいは細胞から分化させた臓器の移植医療に、免疫寛容性を与える可能性がある。

【0185】

(実施例16：共移植での効果)

次に、本発明のフィーダー細胞と、幹細胞とをともに体内に移植した場合の、フィーダー効果を確認する。

【0186】

上述の実施例において、表皮系などの幹細胞シートなどを生体に移植するに際し、本フィーダー細胞を抗生物質または放射線照射で失活させることなく同時に移植することができる。このような処置方法により、生体内において増殖因子分泌作用や補強機能が期待される。

【0187】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的

な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0188】

本発明は、再生医療において、多大な有用性を有する。好ましい実施形態では特に、ヒト細胞をフィーダーとして使用することが本発明において初めて達成されたことから、その有用性は高い。また、脂肪組織という豊富な資源を用いることから、供給源に関する懸念は払拭された。その意味でその有用性は高いといえる。したがって、本発明は、再生医療およびその治療用医薬などを製造する業において利用可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1】 図1は、培養細胞シート移植による角膜再生医療法の開発の模式図を示す。

【図2】 図2は、実施例6におけるコントロールとして用いた3T3フィーダー細胞 (2×10^4 細胞/cm²) での角膜上皮幹細胞の様子である。

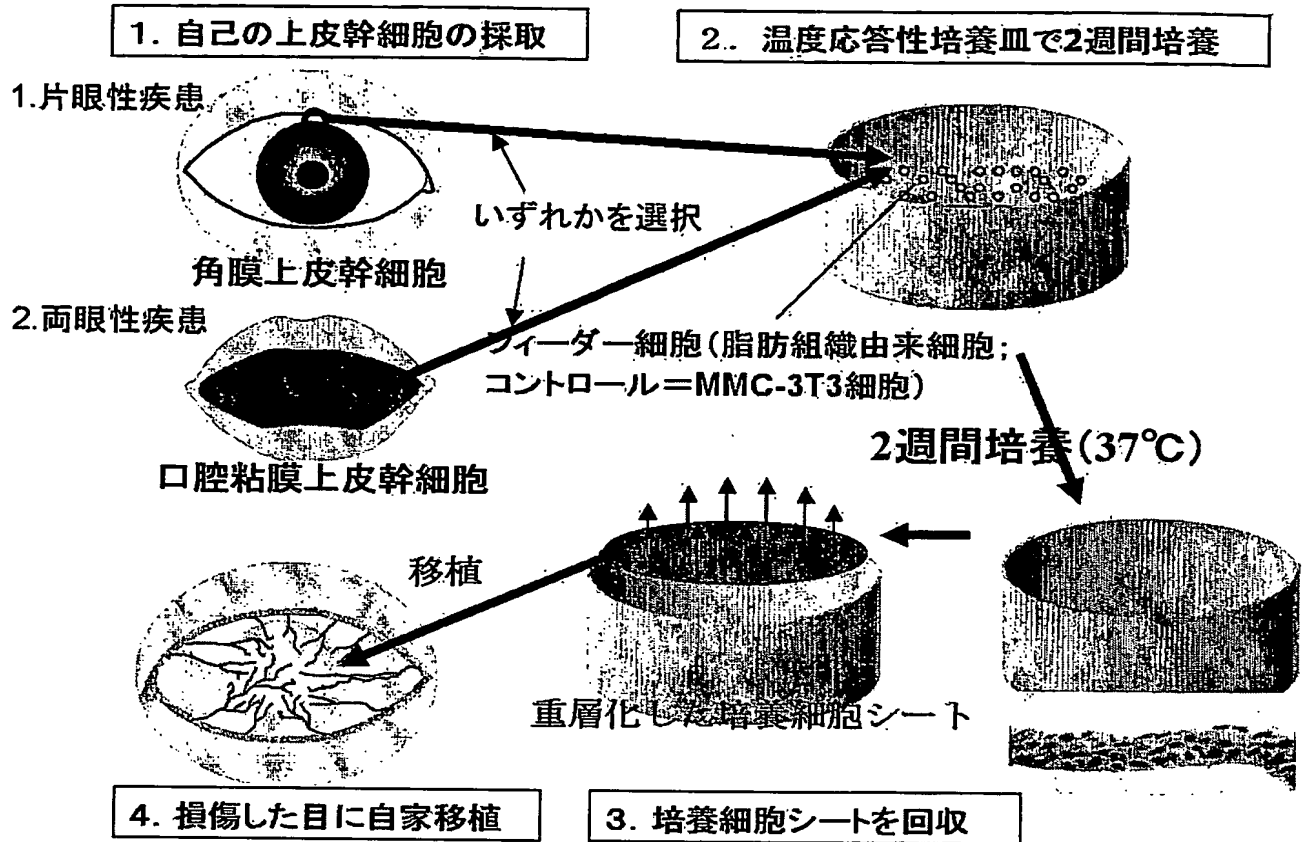
【図3】 図3は、実施例6における本発明のフィーダー細胞（深部組織由来； (1×10^4 細胞/cm²) ）での角膜上皮幹細胞の様子である。上段・下段は、マイトマイシン濃度の相違（上段：40 μg/ml；下段：80 μg/ml）を示す。

【図4】 図4は、実施例6における本発明のフィーダー細胞（皮下組織由来； (1×10^4 細胞/cm²) ）での角膜上皮幹細胞の様子である。上段・下段は、マイトマイシン濃度の相違（上段：16 μg/ml；下段：16 μg/ml）を示す。

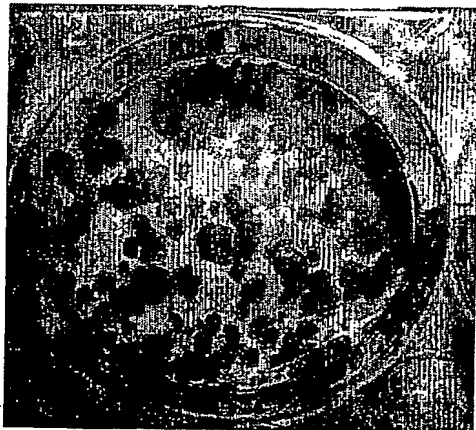
【図5】 図5は、実施例9において示した本発明のフィーダー細胞が有する幹細胞のシート化における効果を実証する写真である。ヒト角膜上皮細胞は、 1×10^5 cells/3.5mm N-イソプロピルアクリルアミド (NIPPAM) を使用する。左は3T3細胞 (2×10^4 cells/cm²)、真ん中はヒト線維芽細胞初代培養細胞 (2×10^4 cells/cm²)、および右はコントロール（フィーダー細胞なし）を示す。上段は培養開始7日目を示し、下段は培養開始10日目を示す。

【書類名】図面

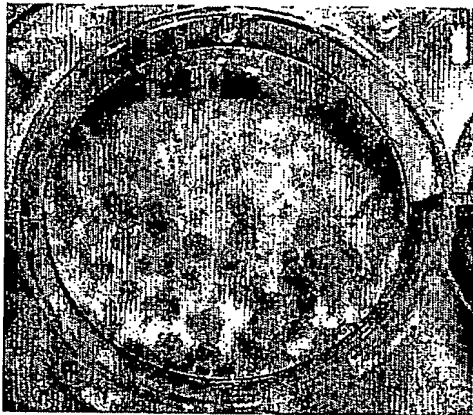
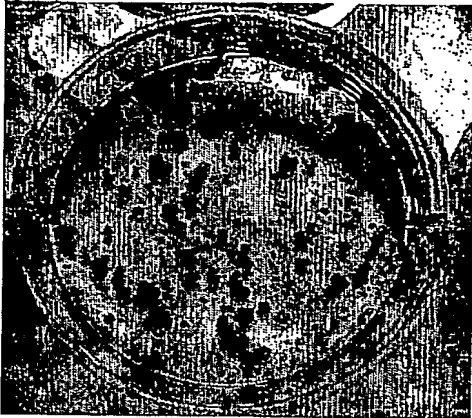
【図 1】



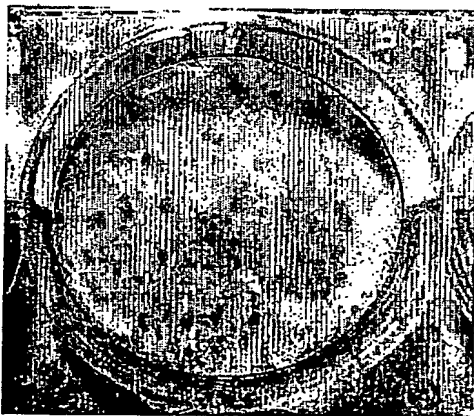
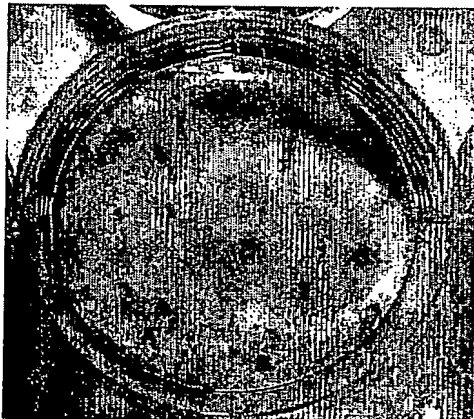
【図 2】



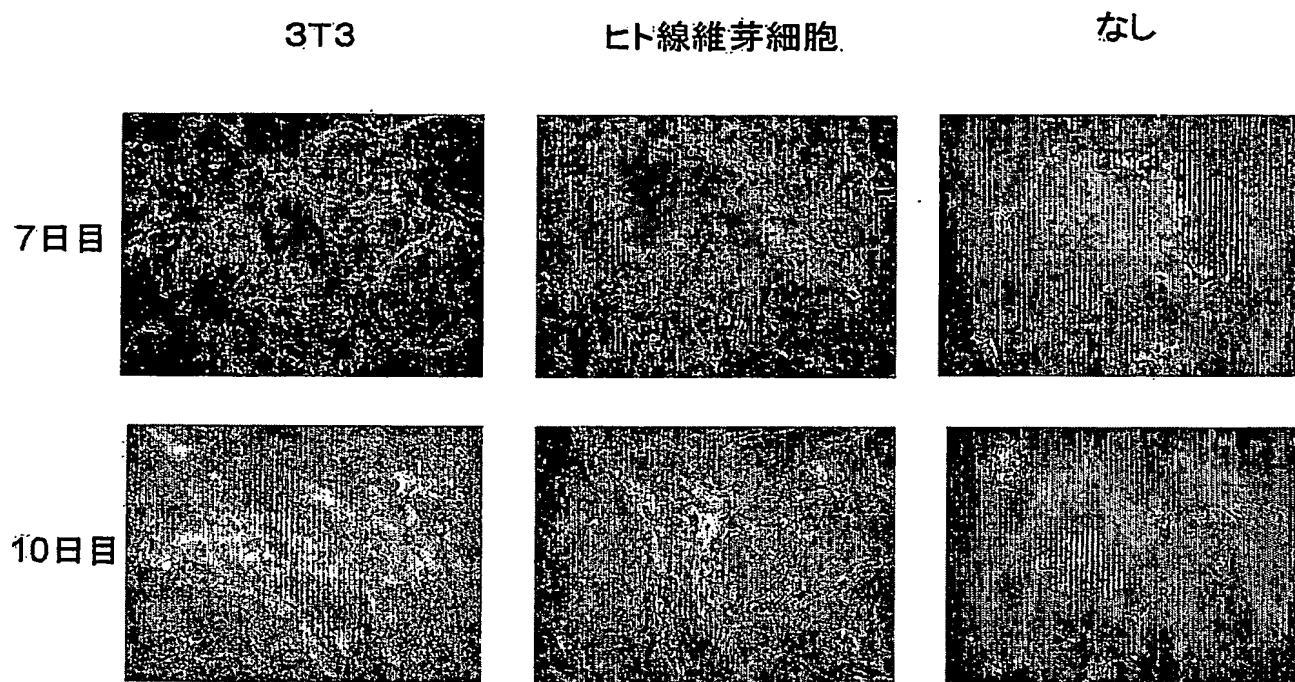
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書**【要約】****【課題】**

本発明は、細胞を用いて効率よく、有効に再生医療に活かせる技術を提供することを課題とする。

【解決手段】

本発明は、被検体の臓器、組織または細胞を再生するための移植物を調製するための方法であって：A) 所望の臓器、組織または細胞の一部またはそれに分化し得る幹細胞を提供する工程；およびB) 該一部または該幹細胞を、脂肪組織に由来する細胞を含むフィーダー細胞上で培養する工程、を包含する、方法を提供する。本発明はまた、そのような方法において使用するフィーダー細胞、システムなども提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 5 4 4 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 1 0 5 9 5 2]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 2 月 1 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府茨木市春日 1 - 1 6 - 5 3
氏 名	西田 幸二
	カーサプリメーロ 6 0 2

特願 2 0 0 3 - 3 5 4 4 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 7 6 9 0 9]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府高石市羽衣 2 丁目 4 - 3 3

氏 名

前田 和久